

Wykorzystanie cytometrii obrazowej do detekcji i oceny ilościowej uszkodzeń DNA w komórkach

Dawid Skoczek

Zakład Biotechnologii Medycznej/Małopolskie Centrum Biotechnologii

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie.

dawid.skoczek@gmail.com

Praca napisana pod opieką: dr. Krzysztofa Szade

Uszkodzenia DNA mogą powodować zaburzenia w funkcjonowaniu szlaków sygnałowych, zmieniać przenoszoną informację genetyczną, a w skrajnych przypadkach prowadzić do śmierci komórki. Źródłami uszkodzeń kwasu deoksyrybonukleinowego są różne czynniki zaliczane do kilku z klas, ze względu na swoje pochodzenie oraz na rodzaj wprowadzanych mutacji. Z uwagi na negatywne działanie mutagenów, w toku ewolucji komórki wytworzyły szereg mechanizmów mających na celu niwelowanie tych szkodliwych skutków. Za mechanizmy te odpowiadają skomplikowane kompleksy białkowe, którym towarzyszą ważne czynniki aktywujące oraz dezaktywujące określone elementy w obrębie szlaków sygnałowych. Punktem docelowym powyższych kompleksów naprawczych jest odzyskanie pierwotnego stanu DNA z jak najmniejszą ingerencją w przenoszoną informację genetyczną.

Świadomość bezpośredniego wiązania się struktur białkowych z naprawianym DNA stała się mobilizacją do poszukiwania metod mających na celu detekcję uszkodzeń DNA poprzez identyfikację połączonych z nim białek. Takie podejście pozwalało na łatwiejsze wyznaczanie miejsc uszkodzenia DNA, jednak stosowane metody obarczone były wieloma ograniczeniami zarówno pod względem oceny ilościowej jak i jakościowej. Ostatnie osiągnięcia z dziedziny techniki pozwoliły połączyć mikroskop fluorescencyjny z cytometrem przepływowym w jedno urządzenie, tworząc cytometr obrazowy. Pozwala on uzyskać obraz pojedynczej komórki w wielu kanałach przy jednoczesnej analizie, w tym statystycznej całych populacji komórek.

Niniejsza praca wykorzystuje zalety nowatorskiej technologii cytometrii obrazowej wraz z klasycznymi immunocytochemicznymi metodami detekcji elementów komórki w celu oceny ilościowej uszkodzeń DNA wywołanych in vitro czynnikami fizyczno-chemicznymi. Zastosowany sposób detekcji ma charakter pośredni - uszkodzenia struktury kwasu deoksyrybonukleinowego potwierdzone testem kometowym zostają wykryte

poprzez oznaczanie lokalizacji białek odpowiedzialnych za jego naprawę w miejscu przyłączenia do struktury DNA.

Wstęp

a) Podwójne i pojedyncze pęknięcia DNA oraz modele ich naprawy

Pojedyncze (ang. SSB – *single strand breaks*), a szczególnie podwójne (ang. DSB – *double strand breaks*) pęknięcia DNA są jednym z najbardziej szkodliwych uszkodzeń materiału genetycznego, zatem muszą zostać szybko naprawione w celu zachowania informacji genetycznej [1]. Organizmy eukariotyczne są wyposażone w kilka różnych mechanizmów naprawczych obejmujących między innymi rekombinację homologiczną (ang. HR – *homologous recombination*) i niehomologiczne łączenie się końców (ang. NHEJ – *non-homologous end joining*) [2].

- NHEJ jest procesem naprawiającym większość uszkodzeń typu DSB i zachodzi we wszystkich etapach cyklu komórkowego. System ten obejmuje modyfikację i ligację uszkodzonych końców z zachowaniem niewielkiej homologii w celu szybkiej naprawy DNA. Powoduje to wprowadzenie małych delecji lub insercji co przy istotności dokładnego odwzorowania uszkodzonego DNA nie jest pożądane [3].

- Mechanizm HR wymaga natomiast rozległego repozycjonowania białek i matrycy naprawczej. Jest przeprowadzany w komórkach eukariotycznych na kilka różnych sposobów, większość z nich zależy od rozpoznawania i łączenia uszkodzonych końców DNA z nieuszkodzonymi sekwencjami ho-

mologicznymi występującymi na chromatydach siostrzanych lub locus alleliczym [3].

Uszkodzenia DNA są powodowane różnymi czynnikami zarówno endogennymi jak i egzogennymi. Do przykładowych czynników egzogennych należą etopozyd i promieniowanie UV, które w opisywanym eksperymencie zostały wykorzystane w celu wyindukowania uszkodzeń DNA w komórkach linii HEK293.

b) UV i etopozyd jako czynniki wywołujące uszkodzenia DNA

Etopozyd jest związkiem organicznym hamującym działanie topoiomerazy II poprzez zablokowanie jej możliwości do ligacji dwóch fragmentów DNA, co ostatecznie skutkuje powstawaniem podwójnych pęknięć DNA (DSB). Oprócz generowania DSB przyczynia się on też do powstania pojedynczych pęknięć DNA (SSB) [4]. Związek ten dodatkowo indukuje tworzenie się wolnych rodników, które mają potencjalną zdolność modyfikacji guaniny do 8-oksoguaniny [5].

Promieniowanie ultrafioletowe jest promieniowaniem elektromagnetycznym, którego długość fali przypada na 100 do 400 nm. Ze względu na skutki działania UV na organizmy żywe wyróżnia się jego trzy podklasy: UV-A, UV-B oraz UV-C. Podtyp UV-C jest najbardziej destrukcyjny dla organizmów, ponieważ długość jego fali przypada na maksimum absorpcji ważnych związków biologicznych. Ekspozycja na promieniowanie UV tworzy głównie

fotoprodukty dipirymidynowe, a dwuniciowe pęknięcia DNA (DSB) powstają jedynie pośrednio przy naprawie innych uszkodzeń [6,7]. Zostało również udowodnione, że naświetlanie komórek promieniowaniem UV tworzy wolne rodniki, które reagując z guaniną obecną w kwasach nukleinowych powodują jej modyfikację do 8-oksoguaniny. 8-oksoguanina ma zdolność do tworzenia par z adeniną zaburzając informację genetyczną [5].

c) Cytometria obrazowa - charakterystyka i zastosowanie

U podstaw cytometrii obrazowej leży połączenie cytometru przepływowego z mikroskopem fluorescencyjnym w jedno urządzenie. Kombinacja tych dwóch technik umożliwia ilościową analizę na poziomie pojedynczej komórki jak ma to miejsce w klasycznej cytometrii przepływowej, a dzięki analizie obrazu, w tym fluorescencyjnego, pozwala na wykonanie wielokanałowego zdjęcia każdej pojedynczej komórce przepływającej przez cele pomiarową [8]. Cytometria obrazowa pozwala nie tylko na ilościową analizę sygnału, ale także na analizę przestrzenną. Detekcja sygnału odbywa się w kilku kanałach, wśród których można wyróżnić: kanały obrazujące komórkę w jasnym polu, kanały SSC (ang. *Side Scatter*) niosące informację o strukturze (ziarnistości) komórki oraz kanały analizujące emisję fluorescencji [8]. Dzięki zastosowaniu takiego spektrum elementów detekcyjnych możliwe jest na przykład uzyskanie informacji na temat lokalizacji białek w komórce poprzez analizę fluorescencji związanych z nimi znakowanych fluorochromami

przeciwiał lub modyfikowaniu tych białek poprzez dodanie domeny emitującej fluorescencje. Możliwe jest też bezpośrednie obrazowanie kwasów nukleinowych w komórce, w tym celu stosuje się fluorescencyjne barwniki wiążące się do DNA lub RNA.

Ogólna zasada działania cytometrii obrazowej jest następująca: fluorochrom związany z komórką przepływającą przez układ cytometru zostaje wzbudzony wiązką lasera o zadanej długości fali, a jego emisja zostaje zarejestrowana zgodnie z jego charakterystyką spektralną. Liczba i emisja stosowanych laserów oraz system optyczny określa liczbę fluorochromów, których sygnał może być jednocześnie rejestrowany [8].

Podsumowując, funkcjonalność cytometrii przepływowej wynika z analizy ilościowej sygnału na poziomie pojedynczej komórki wraz z dużą przepustowością. Połączenie zalet cytometrii przepływowej z możliwością rejestrowania obrazu pojedynczej komórki w różnych kanałach niesie ze sobą nowe zastosowania. Natomiast należy podkreślić, że metoda ta jest mniej przepustowa niż klasyczna cytometria przepływowa, a jakość uzyskanych obrazów jest niższej rozdzielczości w porównaniu do typowej mikroskopii fluorescencyjnej.

Cel pracy

Celem pracy było opracowanie systemu do detekcji uszkodzeń i systemów naprawczych DNA w oparciu o cytometrię obrazową. W tym celu użyto

protokół oparty na indukcji uszkodzeń DNA w komórkach HEK293 przez etopozyd i UV. Następnie dokonano analizy wybranych markerów uszkodzeń i naprawy DNA z wykorzystaniem *Image Stream* firmy Amnis.

Metodyka

a) Hodowla komórek HEK293

Komórki hodowano w inkubatorze, w którym panowały stałe warunki: 20% O₂, 5% CO₂, 37°C. Naczyniem hodowlanym były szalki o średnicy 10 cm. Na każdą z nich przypadało 8 ml pożywki, której bazą był DMEM (Gibco) o zawartości glukozy 4,5 mg/ml z 10% dodatkiem surowicy wołowej (ang. FBS – *fetal bovine serum*) (Biowest) i penicyliną oraz streptomycyną - 100 jednostek/ml (Gibco). Do doświadczenia przygotowano w sumie 22 takie szalki komórek o konfluencji wynoszącej 85%. Wykonano jedno powtórzenie eksperymentu.

b) Barwienia immunofluorescencyjne

Wszystkie kolejne procedury wykonywano w temperaturze pokojowej, a wirowanie odbywało się zawsze przy 220 g przez 5 minut, natomiast użyty PBS (ang. phosphate buffered saline) (Biowest) nie zawierał jonów Ca²⁺ i Mg²⁺. Do blokowania użyto 3% BSA (ang. bovine serum albumin) (Sigma) w PBS z 0,05% Tritonem (Sigma). Przygotowane grupy badawcze i kontrolne:

- Grupa badawcza - 10 szalek z komórkami naświetlanymi UV i inkubowanymi z etopozydem, które były następnie inkubowane kolejno z prze-

ciwiałami I i II rzędownymi.

- Grupa kontrolna I - 10 szalek z komórkami nienaświetlanymi UV bez inkubacji z etopozydem, które były następnie inkubowane z przeciwciałami I i II rzędownymi.

- Grupa kontrolna II - 2 szalki z komórkami naświetlanymi UV i inkubowanymi z etopozydem. Do zawiesiny komórek z jednej szalki zostały dodane tylko przeciwciała II rzędowne anty-mysie, a do drugiej zawiesiny anty-królicze. Próba została wykonana z uwagi na fakt, że wśród testowanych dziesięciu przeciwciał pierwszorzędowych dwa przeciwciała są pochodzenia mysiego, a 8 króliczego (*Tab. 1*)

Tuż przed wykonaniem barwień w grupie badawczej i grupie kontrolnej II zmieniono pożywkę na zawierającą etopozyd (20 µg/ml) i poddano inkuba-

Tabela 1. Spis zastosowanych przeciwciał

Nr	Nazwa, producent	Rodzaj, organizm	Zastosowanie
1	anty-jednociowy DNA (Enzo)	monoklonalne, mysie	Pozwala na wyrycie obecności deoksycytydyny ssDNA.
2	anty-p-Clk2 (fosforylowane na S33/35) (abcam)	monoklonalne, królicze	Wiąże się do fosfokinazy punktu kontrolnego numer 2 cyklu komórkowego, która przylacza się do uszkodzonego DNA, głównie w obrębie podwójnych pęknięć (DSB). Fosforylacja na S33/S35 zachodzi po uszkodzeniu DNA.
3	anty-ATR (fosforylowane na T1989) (abcam)	poliklonalne, królicze	Rozpoznaje kinazę białkową seryna/treonina ATR, która w sytuacjach stresu genotoksycznego fosforyluje szereg białek zaangażowanych w odpowiedź na uszkodzenie DNA, w tym histon gH2AX na Ser139 w miejscach uszkodzenia DNA, regulując tym samym mechanizm odpowiedzi na uszkodzenie DNA.
4	fosfo-ATM (fosforylowane na S1981) (R&D Systems)	poliklonalne, królicze	Rozpoznaje kinazę białkową (ATM). ATM pod wpływem uszkodzeń DNA ulega fosforylacji na Ser1981 co powoduje, że ulega rozpadowi do monomerów.
5	anty-ATR (abcam)	monoklonalne, królicze	Rozpoznaje białko ATR niezależnie od fosforylacji.
6	TIF1beta (Cell Signaling Technology)	monoklonalne, królicze	Wiąże się do czynnika transkrypcyjnego I beta, który odpowiada za aktywację transkrypcji genów w odpowiedzi na sygnały środowiskowe lub przebudowę chromatyny. Fosforylacja TIF1beta na Ser842 zachodzi w sposób zależny od ATM w odpowiedzi na stres genotoksyczny i jest niezbędna dla relaksacji chromatyny, która z kolei jest wymagana do odpowiedzi na uszkodzenie DNA.
7	ATF-4 (D488) (Cell Signaling Technology)	monoklonalne, królicze	Rozpoznaje czynnik transkrypcyjny ATF-4, indukowany podczas stresu siateczki cytoplazmatycznej, jak również podczas uszkodzenia DNA indukowanego przez cisplatinę. Reguluje ekspresję genu Ap1 zaangażowanego w naprawę DNA.
8	KAP-1 (S824) (abcam)	poliklonalne, królicze	Rozpoznaje białko KAP-1 związane z regulacją heterochromatyny. Jest fosforylowane przez ATM na Ser824 w odpowiedzi na uszkodzenie DNA i akumuluje się w miejscach uszkodzenia.
9	anty-Clk2 (abcam)	poliklonalne, królicze	Podobnie jak przeciwciało numer 2 wiąże się do Clk2, natomiast niezależnie od fosforylacji.
10	anty-8-oksoguanina (abcam)	monoklonalne, mysie	Wiąże się do 8-oksoguaniny w DNA. Guanina pod wpływem reaktywnych form tlenu, ulega konwersji do 8-oksoguaniny, co w rezultacie może prowadzić do mutacji.

cji, najpierw dziesięciominutowej w cieplarni, a następnie półgodzinnej pod laminarnym, w czasie której odkryte szalki poddawano działaniu UV. Komórkom z grupy kontrolnej I również zmieniono medium na niezawierające etopozytu i inkubowano równolegle do próby badawczej bez wpływu UV. Po inkubacjach komórki ze wszystkich szalek zebrano z użyciem trypsyny (Gibco) o stężeniu 0,25% i przeniesiono do próbek typu FACS tak, aby zawiesina komórek z jednej szalki trafiła do jednej próbki. Całość zwirowano i następnie usunięto supernatant. Kolejno komórki zawieszono w 100 µl PBS, dodano 100 µl 4% paraformaldehydu (Sigma), inkubowano 5 minut, zwirowano. Nadsącz zlano, dodano 100 µl roztworu PBS z 0,2% dodatkiem Triton X100 (Sigma) i inkubowano 5 min. Dodano 1 ml PBS i wirowano. Supernatant zlano, dodano przeciwciała pierwszorzędowe w ilości 100 µl każde rozcieńczone w 3% BSA w stosunku objętościowym 1:200 i dodano je do komórek grupy badawczej i grupy kontrolnej I, tak żeby na jedną próbkę z grupy kontrolnej I i grupy badawczej przypadł jeden rodzaj testowanych przeciwciał, inkubowano 30 min w temperaturze pokojowej i zwirowano. Supernatant zlano, przygotowano po 100 µl roztworu przeciwciał drugorzędowych w 3% BSA w PBS w stosunku 1:400 i dodano je do wszystkich 20 próbek. Do próbek, do których wcześniej dodano przeciwciała pierwszorzędowe królicze trafiło przeciwciało drugorzędowe anty-królicze, a tam gdzie mysie, przeciwciało anty-mysie. Do jednej z próbek grupy

kontrolnej II dodano roztworu przeciwciał drugorzędowych anty-mysich, a do drugiej anty-króliczych. Inkubowano 30 minut, dodano 1 ml PBS i zwirowano, nadsącz zlano zawieszono je w 100 µl PBS z dodatkiem 2% FBS. Próbkę badano w cytometrze obrazowym *ImageStream*.

c) Elektroforeza kometowa

Procedurę przeprowadzono z użyciem komórek HEK293 na podstawie protokołu zamieszczonego z zestawem odczynników do elektroforezy kometowej (zestaw #4250-050-K, Trevigen). Przed rozpoczęciem wykonywania protokołu komórki inkubowano w cieplarni przez 10 minut z pożywką zawierającą etopozyd (20 µg/ml), a następnie inkubowano je pół godziny pod laminarnym gdzie naświetlano je UV. Po inkubacji komórki zebrano za pomocą trypsyny (Gibco) o stężeniu 0,25% i poddano lizie alkalicznej. Po zakończeniu doświadczenia analizę przeprowadzono w programie *OpenComet* [9].

d) Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono w programie *Graphpad*. W przypadku analiz z wykorzystaniem cytometrii obrazowej w każdej grupie badano od kilkuset do kilkunastu tysięcy wstępnie wybramkowanych komórek. Dla każdej analizy uzyskano wartość średnią liczby spotów wraz z odchyleniem standardowym, natomiast na rycinach przedstawiono różnicę pomiędzy średnimi wartościami liczby spotów w grupie stymulowanej i niestymulowanej.

Wyniki

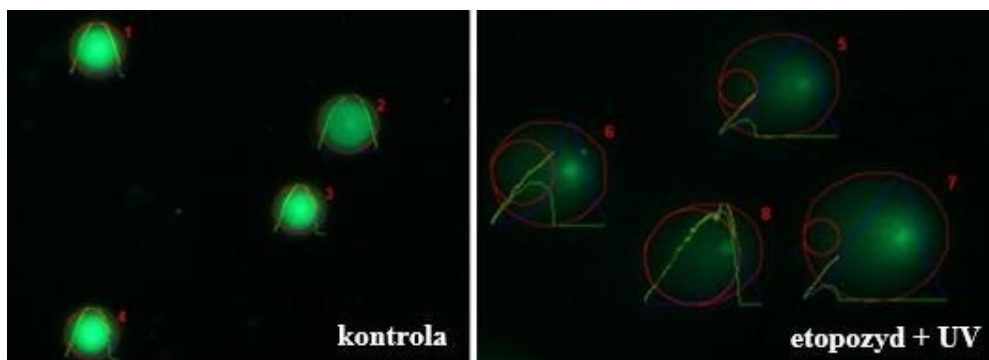
a) Ocena skuteczności indukcji uszkodzeń DNA.

Aby potwierdzić istnienie uszkodzeń DNA indukowanych etopozydem i UV opartym o stosowany protokół w pierwszej kolejności przeprowadzono elektroforezę kometową w wersji alkalicznej, która jest uznawana za bezpośrednią metodę oceny uszkodzeń DNA [10]. Miała ona na celu bezpośrednie potwierdzenie uszkodzeń materiału genetycznego poprzez analizę obszaru ogona, jego momentu i długości w kometach komórkowych. Jak zaprezentowano, wyniki elektroforezy kometowej potwierdziły (Ryc. 1; Ryc. 2), że zastosowany etopozyd i UV

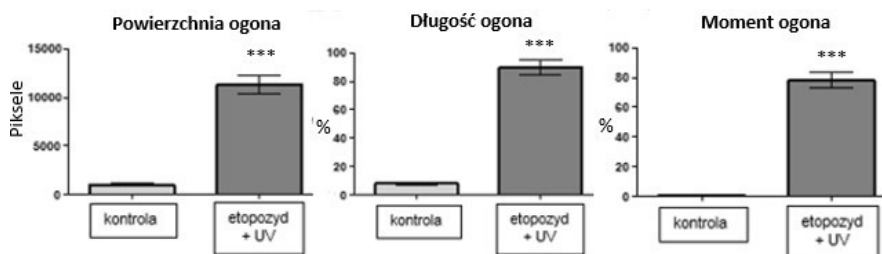
są induktorami utraty ciągłości nici DNA.

b) Analiza obrazu barwionych komórek

Przedstawione poniżej zdjęcia pokazują białka naprawy DNA, które jak widać koncentrują się lokalnie w miejscu uszkodzenia tworząc tak zwane spoty (ang. foci) (Ryc. 3). Celem pracy była ilościowa analiza, czyli zliczenie ilości spotów odpowiadającym akumulacji białek naprawczych w miejscu uszkodzeń DNA. W tym celu wykorzystano program *Ideas* i szukano parametrów, które pozwoliłyby na utworzenie masek porównujących liczbę spotów w komórkach, a następnie ich zliczanie.

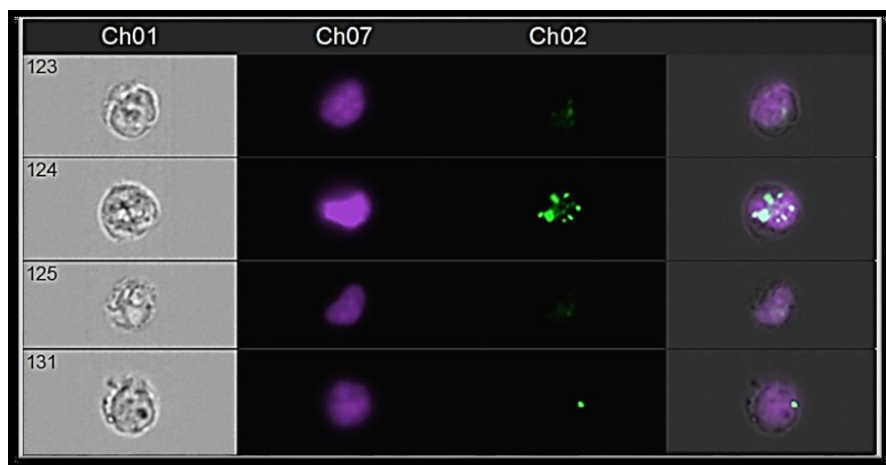


Ryc. 1. Zdjęcia komórek HEK293 wraz z zaznaczonymi badanymi parametrami po elektroforezie kometowej. Na zielono został wybarwiony DNA jądrowy.



Ryc. 2. Elektroforeza kometowa - wyniki pomiarów.

*** - $p < 0.001$; test t-studenta.

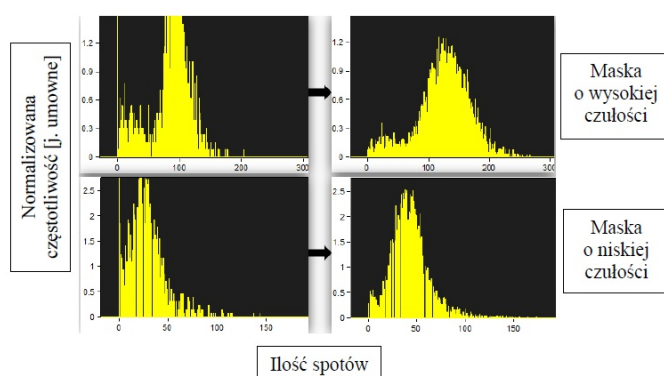


Ryc. 3. Fragment ekranu analizy zdjęć badanych komórek.

Opis kanałów: Ch01 – jasne pole, Ch07 – DAPI (wybarwiony DNA jądrowy), Ch02 – FITC (8-oksoguanina), ostatnia kolumna – wszystkie kanały połączone.

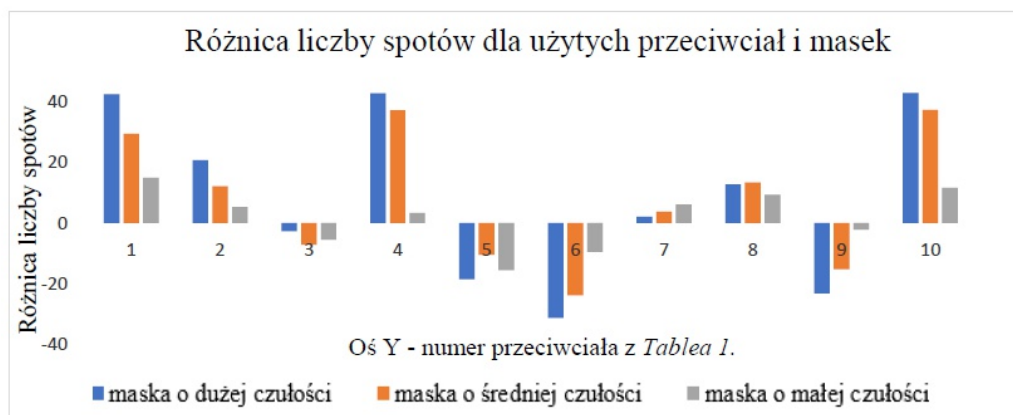
Stworzono trzy maski: o niskiej, średniej i wysokiej czułości. Każda z tych masek jest algorytmem uwzględniającym intensywność fluorescencji oraz minimalną powierzchnię obszaru zakwalifikowaną jako odrębny spot. Maska o niskiej czułości wykrywała duże spoty objawiające się silnym sygnałem, maska wysokiej czułości analizuje małe spoty, które objawiają się słabym sygnałem, natomiast maska średniej czułości reprezentuje klasę pośrednią

między wcześniej wymienionymi maskami. Maski były tworzone na podstawie arbitralnie wybranych komórek wykazujących dużą, średnią i małą ilość spotów. Ostatecznie na podstawie empirycznych ustawień pokazano, że pomimo wysokiego tła, algorytm o wysokiej czułości wykazywał większą różnicę spotów pomiędzy grupą niestymulowaną, a grupą stymulowaną (Ryc. 4).



Ryc. 4. Liczba spotów dla maski o dużej czułości i niskiej czułości na przykładzie przeciwciała anti-jednoniciowy DNA.

Kolumna pierwsza – grupa niestymulowana UV i etopozydem, kolumna druga – grupa stymulowana.



Ryc. 5. Różnica liczby spotów dla poszczególnych typów przeciwciał i zastosowanych masek.

c) Analiza wyników

Otrzymane wyniki dla każdego typu przeciwciała opracowano odejmując ilości spotów dla poszczególnych masek próby badawczej (komórki naświetlane UV i inkubowane z etopozydem) od próby kontrolnej (komórki nie naświetlane UV i bez inkubacji z etopozydem). Całość danych została zanalizowana i obliczona w programie *Imgaes* (Ryc. 5).

Wnioski i dyskusja wyników

Podsumowując, przeprowadzona analiza z wykorzystaniem cytometrii obrazowej pozwoliła na detekcję i ilościową ocenę białek, które są związane z uszkodzeniami DNA oraz markerów uszkodzeń DNA po stymulacji etopozydem i UV. Wśród analizowanych białek i markerów można wyróżnić trzy grupy:

a) W układzie badawczym barwienie z użyciem przeciwciał rozpoznających jednoniciowe DNA, fosfo-ATM (S1981) oraz 8-oksoguaninę, osiągnęło największą różnicę spotów pomiędzy pró-

bą badawczą, a kontrolną. Jednoniciowe DNA oraz fosfo-ATM (S1981) to klasyczne markery uszkodzeń DNA dlatego ich silna ekspresja w stworzonym układzie eksperymentalnym była spodziewana. Obecność sygnału pochodzącego od 8-oksoguaniny może świadczyć o stosunkowo wysokim stężeniu reaktywnych form tlenu powodujących modyfikację guaniny do formy 8-oksoguaniny [5].

b) Sygnał od przeciwciał: p-Chk2 (S33/35), ATF-4 (D488) i fosfo-KAP-1 (S824) był widoczny lecz słabszy - analizowana różnica liczby spotów waha się w tej grupie od 2,14 do 20,84. Może to świadczyć, że przy takich warunkach eksperymentu i w tym typie komórek, białka wykrywane przez te przeciwciała lub ich fosforylowane formy nie biorą udziału w odpowiedzi na uszkodzenia DNA albo potrzebują więcej czasu na rozpoczęcie procesów naprawczych.

c) Przeciwciała: anty-p-Chk2 (fosfo T1989), anty-ATR, TIF1beta, wykazały większą obecność markerów naprawy w próbach kontrolnych niż badaw-

czych. Różnica w ilości spotów pomiędzy próbą badawczą, a kontrolną wynosi od -2,72 do -31,37 dla maski o wysokiej czułości. W przypadku Chk2 widać, że spada ilość całkowitego białka niezależnie od jego fosforylacji, natomiast rośnie ekspresja formy fosforylowanej S33/S35, co jak pokazano jest związane z odpowiedzią na uszkodzenia DNA [11]. Pozostałe białka (ATR oraz TIF1beta) wykazują inną kinetykę aktywności w odpowiedzi na uszkodzenia DNA niż pozostałe analizowane mechanizmy. Jednoznaczna interpretacja tego wyniku jest trudna, jednakże widać, że same uszkodzenia mają wpływ na zmianę ekspresji tych markerów.

Otrzymane wyniki potwierdzają, że można wykorzystać cytometrię obrazową do optymalnej, ilościowej oceny markerów naprawy oraz uszkodzeń DNA.

Bibliografia

- [1] A. Mehta, J.E. Haber, Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Recombinational DNA Repair. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014
- [2] A. Kakarougkas, P. A. Jeggo, DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism. Br J Radiol, 2014 [3] W. J. Cannan, D. S. Pederson, Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin. J Cell Physiol. 2016
- [4] A. Muslimović, S. Nyström, Y. Gao, O. Hammarsten, Numerical Analysis of Etoposide Induced DNA Breaks. PLoS One. 2009
- [5] E. M. Aldred, C. Buck, K. Vall, Pharmacology A Handbook for Complementary Healthcare Professionals. 2009, s41-52
- [6] K. S. Oh, M. Bustin, S. J. Mazur, E. Appella, K. H. Kraemer, UV-induced histone H2AX phosphorylation and DNA damage related proteins accumulate and persist in nucleotide excision repair-deficient XP-B cells. DNA Repair (Amst). 2011
- [7] R. Greinert, B. Volkmer, S. Henning, E. W. Breitbart, K. O. Greulich, M. C. Cardoso, A. Rapp, UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. Nucleic Acids Research. 2012
- [8] E. K. Zuba-Surma, M. Kucia, M. Ratajczak, Technologia ImageStream - krok dalej niż Cytometria przepływowa. Postępy Biologii. 2007, tom 34, s361-376 [9] B. M. Gyori, G. Venkatachalam, P. S. Thiagarajan, D. Hsu, OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. Redox Biol. 2014 [10] Y. Lu, Y. Liu, C. Yang, Evaluating In Vitro DNA Damage Using Comet Assay. J Vis Exp. 2017
- [11] G. Buscemi, L. Carlessi, L. Zannini, et al. DNA damage-induced cell cycle regulation and function of novel Chk2 phosphoresidues. Mol Cell Biol. 2006